





دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین
دانشکده بهداشت

عنوان

ارزیابی فصلی آلودگی آفلاتوکسین M1 در شیرهای خام مراکز جمع آوری شیر خام استان قزوین

استاد راهنما

دکتر پیمان قجر بیگی

اساتید مشاور

دکتر رزاق محمودی

دکتر غلامرضا جاهد خانیگی

دانشجو

مرضیه پالیزبان

آبان ماه ۱۳۹۴

مقدمه

مایکوتوکسین ها متابولیت های ثانویه و پایدار قارچی هستند که از طریق آلوده ساختن خوراک دام و غذای انسان ، می توانند باعث بیماری و حتی مرگ انسان شوند (۱ و ۲) .

گرچه بیش از ۲۰۰ نوع متابولیت ثانویه برای قارچ ها شناسایی شده است اما آفلاتوکسین ها شناخته شده ترین آن ها بوده و بیش از بقیه مورد مطالعه قرار گرفته اند (۲) .

جدول سرانه ی شیر در مناطق شهری و روستایی طی سال های ۱۳۸۶-۱۳۹۱ بر حسب کیلوگرم (۴۱)

| سال | ۱۳۸۶ | ۱۳۸۷ | ۱۳۸۸ | ۱۳۸۹ | ۱۳۹۰ | ۱۳۹۱ |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| شهری | ۴۳/۹۵ | ۴۴/۳۵ | ۴۶/۴۶ | ۴۵/۰۹ | ۳۵/۷۱ | ۲۹/۱۳ |
| روستایی | ۵۲/۲۶ | ۴۸/۶۴ | ۴۷/۸۷ | ۴۸/۹۲ | ۴۳/۷۶ | ۴۶/۳۷ |

عوارض آفاتوکسین ها

🏠 آفاتوکسین ها باعث ایجاد سمیت حاد می شوند و هم چنین دارای ویژگی های سرکوب گری سیستم ایمنی ، جهش زایی ، ناقص الخلقه زایی و همچنین سرطان زایی می باشند (۳) .

🏠 علائم مسمومیت مزمن با آفاتوکسین شامل آسیب کبدی ، کاهش رشد ، آسیب کلیوی ، آنمی ، اختلال در سیستم ایمنی ، اختلال در ساخت پروتئین و متابولیسم چربی و علائم حاد آن نیز شامل افسردگی ، بیماری های اعصاب ، دردهای شکمی ، اسهال ، گشادشدگی رکتوم و نهایتاً مرگ می باشد (۴) .

گروه های آفلاتوکسین

تاکنون بیش از ۱۸ نوع آفلاتوکسین شناخته شده است که از میان آن ها انواع **G1** ، **B1** و **M1** بیشترین اهمیت را دارند و در بین آن ها آفلاتوکسین **B1 (AFB1)** از همه خطرناک تر بوده (۵) و به عنوان قوی ترین ترکیب سرطان زای طبیعی شناخته می شود (۶).

قارچ های آسپرژیلوس فلاووس (**A.flavous**) ؛ آسپرژیلوس پارازیتیکوس (**A.parasiticus**) و آسپرژیلوس نومیوس (**A.numius**) قادر به تولید آفلاتوکسین های **B1** ، **B2** ، **G1** و **G2** می باشند (۷و۸و۹و۱۰).

آفلاتوکسین M1

📅 پستاندارانی که AFB1 را از طریق جیره ی غذایی خود دریافت می کنند بین ۱ تا ۳ درصد آن را به فرم آفلاتوکسین (AFM1) M1 در شیر خود وارد می کنند (۱۰) . بنابراین برای جلوگیری از ورود AFM1 به شیر بایستی در گام نخست از ورود AFB1 به جیره غذایی دام های شیری جلوگیری نمود (۱۱) .

📅 AFM1 که در حقیقت مشتق هیدروکسیله AFB1 است ، در کبد حیوان تولید می شود و به ویژه در بخش پروتئینی شیر باقی می ماند (۱۲) .

📅 گرچه سمیت AFM1 از AFB1 کم تر است اما هر دو سرطان زا بوده به گونه ای که آژانس بین المللی تحقیقات سرطان AFB1 را در گروه ۱ و AFM1 را در گروه ۲ مواد سرطان زا قرار داده است (۱۱) .

ادامه آفلاتوکسین M1

📅 شیر یکی از منابع با ارزش تغذیه انسان (۱۳) و البته بزرگترین منبع ورود **AFM1** به بدن انسان است (۱۴). از این روی آلودگی شیر و فرآورده هایش می تواند به عنوان خطری جدی، تهدید کننده ی سلامت جامعه باشد (۱۵) و از آن جائیکه **AFM1** به حرارت پاستوریزاسیون، اتوکلاو و دیگر روش های سالم سازی مقاومت نشان می دهد و این اقدامات در کاهش آن بی تاثیر می باشند (۱۶ و ۱۷).

📅 اکثر کشورها قوانینی جهت کنترل میزان **AFM1** در شیر جهت کاهش این خطرات دارند (۱۸). حد مجاز **AFM1** در کشور های اروپایی ۰/۰۵ میکروگرم در کیلوگرم، (۱۹) و در ایران ۰/۱ میکروگرم در کیلوگرم می باشد (۲۰).

📅 برای سنجش آفلاتوکسین می توان از روش های متعدد نظیر مواد جاذب شیمیایی، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و آزمون **ELISA** استفاده نمود (۲۱ و ۲۲ و ۲۳).

بررسی مطالعات

📅 در مطالعه ی کریم و خراسانی در سال ۷۵ بر روی شیرهای تحویلی به کارخانه شیر پاستوریزه تهران ، با روش **ELISA** ، ۸۲/۲٪ از نمونه ای تحویلی آلودگی بالاتر از حد مجاز استاندارد کشورهای اروپایی را به **AFM1** داشتند (۲۴) .

📅 در مطالعه کامکار در سال ۲۰۰۲ و سپس در سال ۲۰۰۸ بر روی نمونه های شیر استرلیزه به ترتیب ۷۹/۹۲٪ و ۱۰۰٪ نمونه ها آلوده به آفلاتوکسین بودند (۲۵ و ۲۶) .

📅 در مطالعه صورت گرفته در شهر شیراز در سال ۸۳ با روش **ELISA** ؛ 100٪ نمونه های شیر پاستوریزه ی جمع آوری شده ، آلوده به **AFM1** بودند که از این میان ۱۷/۸٪ نمونه ها سطح آلودگی بیش از ۰/۰۵ میکروگرم در کیلوگرم را نشان دادند (۲۷) .

📅 در بررسی دیگر کامکار در سال ۲۰۰۵ روی شیرهای خام تولیدی شهرستان سرآب ۷۶/۶٪ نمونه ها ، آلوده به **AFM1** بودند (غلظت سم در ۴۰٪ نمونه ها بالاتر از حد مجاز اتحادیه اروپا بود) (۲۸) .

📅 در سنجش میزان آلودگی شیر پاستوریزه به **AFM1** با روش **ELISA** در طی دو فصل سرد و گرم (۸۷-۸۸) در تهران ؛ از ۸۴٪ نمونه های آلوده به **AFM1** ؛ ۴٪ نمونه ها میزان آلودگی بالاتر از استاندارد ایران را داشتند (۲۹) .

ادامه بررسی مطالعات

📅 در مطالعه ای بر روی شیر های پاستوریزه شهرستان گناباد توسط مختاریان دلویی و محسن زاده با روش **ELISA**؛ 34 نمونه از ۴۵ نمونه اخذ شده در زمستان و پاییز و ۱۸ نمونه از ۴۵ نمونه اخذ شده در بهار و تابستان؛ میزان آلودگی بیش از ۵۰ نانوگرم بر کیلوگرم را با **AFM1** به ثبت رسانید (۳۰).

📅 در مطالعه صورت گرفته توسط صادقی و هم کاران در سال ۸۹ با روش **ELISA**؛ ۹۲/۱۸٪ نمونه های شیر خام جمع آوری شده در کرمانشاه، آلودگی بیش از ۰/۵ میکروگرم بر کیلوگرم را نشان دادند (۳۱).

📅 ارزیابی صورت گرفته با روش الایزا روی شیر و گوشت گاو میش کشتاری در شمال غرب ایران نمایانگر آلودگی تمامی نمونه های مورد بررسی به **AFT** (آفلاتوکسین کل) و **AFM1** بود و ۴۰٪ نمونه های شیر واجد **AFM1** به میزانی بالاتر از حد مجاز اتحادیه اروپا را داشتند (۳۲).

📅 در بررسی شیر خام و پاستوریزه توسط واقف و محمودی طی دو فصل تابستان و زمستان (۲۰۱۱ - ۲۰۱۲) در غرب ایران با روش الایزا؛ **AFM1** در ۴۷/۹۱٪ نمونه ها با متوسط غلظت $39/45 \pm 18/40$ نانوگرم بر کیلوگرم مشاهده شد (۳۳).

📅 مطالعه ی صورت گرفته توسط محمودی (با روش الایزا) در سال ۲۰۱۲ موید آلودگی ۵۴.۴٪ نمونه های شیر گاومیش در ناحیه ی شمال غرب ایران به **AFM1** با متوسط غلظت 38.5 ± 0.12 نانوگرم بر کیلوگرم بوده است (۳۴).

بررسی میزان آلودگی به AFM1

در خارج از کشور (۳۶ و ۳۷ و ۳۸ و ۳۹ و ۴۰)

| مکان انجام مطالعه | میزان آلودگی به AFM1 | بالاترین میزان آلودگی |
|-----------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| Croatia | eastern | 764.4(ng/kg) |
| | western | |
| | Othr regions | |
| Central Italy | 5-25(ng/kg) | - |
| Sao Paulo(Brazil) | 0.021(μ/kg) | 10.1% از نمونه بیش از استاندارد اروپا |
| Addis Ababa(Ethiopia) | 92% بیش از 50(ng/kg) | 4977(ng/kg) |
| Algeria | 11% نمونه ها 9-103(ng/kg) | 1 نمونه بیش از استاندارد اروپا |

هدف اصلی طرح

ارزیابی فصلی آلودگی آفلاتوکسین M1 در شیرهای خام مراکز جمع
آوری شیر خام استان قزوین

اهداف فرعی

- I. تعیین میزان AFM1 در شیرهای خام مراکز جمع آوری شیر خام استان قزوین و مقایسه آن با استاندارد ایران
- II. تعیین میزان AFM1 در شیرهای خام مراکز جمع آوری شیر خام استان قزوین و مقایسه آن با کشورهای اروپایی
- III. مقایسه وضعیت آلودگی نمونه های شیرخام جمع آوری شده در مراکز جمع آوری شیر خام استان قزوین به AFM1 طی فصول مختلف

فرضیات

- I. میزان AFM1 در شیرهای خام مراکز جمع آوری شیر خام استان قزوین بیشتر از حد استاندارد باشد.
- II. میزان AFM1 در شیرهای خام مراکز جمع آوری شیر خام استان قزوین در فصل های بهار ، تابستان ، پائیز و زمستان متفاوت باشد .
- III. شرایط محیطی طی فصول مختلف (دما ، رطوبت و ...) بر میزان آلودگی AFM1 در شیرهای خام مراکز جمع آوری شیر خام استان قزوین تاثیر گذار می باشد.

اهمیت پژوهش

با در نظر گرفتن این حقیقت که در مراکز جمع آوری شیر در سطح شهرها ؛ طی بازرسی های روتین (بهداشت محیط و دام پزشکی) هیچ نوع آزمایشی مبنی بر تعیین سطح M1 در فرآورده های لبنی عرضه شده صورت نمی پذیرد و ازدیگر سو غالبا شهروندان با این فرض که محصولاتی که به شکل سنتی و غیر پاستوریزه عرضه می شوند از کیفیت بالاتری برخوردارند اقدام به خرید آن می نمایند ، ضرورت انجام چنین پژوهشی مشخص می شود .

روش کار

تعداد ۶۰ نمونه شیر خام از مراکز جمع آوری شیر خام استان قزوین ؛ طی فصول مختلف سال ۹۴ - ۹۵ جمع آوری خواهند شد (تعداد ۱۵ نمونه در هر فصل) . نمونه های شیر خام داخل لوله فالكون جمع آوری و با کد مشخص خواهند شد . سپس تحت شرایط مناسب و توصیه شده به آزمایشگاه بهداشت و ایمنی مواد غذایی منتقل و تا زمان ارزیابی در شرایط فریز نگه داری خواهند شد .

آنالیز داده های به دست آمده از آنالیز مقادیر **AFM1** (تعیین شده با روش **ELISA**) با استفاده از نرم افزار **SPSS** و آنالیز واریانس **ANOVA** مورد ارزیابی قرار خواهند گرفت . اختلاف آماری در سطح $p < 0.05$ معنی دار خواهد بود .

آماده سازی نمونه ها

📅 جهت آماده سازی نمونه ها ؛ نمونه های شیر را در یخچال معمولی قرار خواهیم داد تا دمای آن به کم تر از ۱۰ درجه ی سانتی گراد برسد . سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۵۰۰ g ؛ سانتریفوژ و لایه رویی حاوی چربی با استفاده از پیپت پاستور حذف خواهد شد . مایع زیرین باقی مانده راجهت انجام آزمون الایزا مورد استفاده قرار خواهیم داد .

📅 به تعداد کافی چاهک کیت از بسته بندی خارج و در قالب مربوطه تعبیه خواهیم نمود . ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه های شیر چربی زدایی شده در چاهک ها جداگانه قرار خواهند گرفت . از استانداردهای شماره ۱ تا ۶ به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر داخل چاهک خواهیم ریخت و پلیت را به آرامی با چرخاندن مخلوط و به مدت نیم ساعت در دمای اتاق در تاریکی قرار خواهیم داد . مایع موجود در حفرات ، تخلیه و داخل آنها را ۳ بار با بافر شست و شوی تعبیه شده در کیت خواهیم شست . ۱۰۰ میکرولیتر کونژگه آنزیمی که به نسبت ۱ به ۱۱ در بافر شماره ۲ رقیق شده را به هر حفره اضافه و بعد از مخلوط شدن به آرامی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار خواهیم داد . سپس مایع موجود در حفرات را تخلیه و داخل آن ها ۳ بار با بافر شست و شو ؛ خواهیم شست . ۱۰۰ میکرو لیتر از سوبسترای کروموژن را اضافه و پس از مخلوط نمودن به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی در دمای محیط انکوبه خواهیم نمود .

📅 برای ختم واکنش ، ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده را افزوده و حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد ؛ جذب حفرات در طول موج ۴۵۰ نانومتر در مقابل هوا را قرائت خواهیم نمود (۳۵) .

رفرنس

- ▶ 1. Binder, E.M. (2007). Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. Feed Science and Technology. 133:149-166.
- ▶ 2. Elkak A, Abbas M, Oula EA. A survey on the occurrence of aflatoxin M1 in raw and processed milk samples marketed in Lebanon. Food Control 2011; 22: 1856-1858.
- ▶ 3. Trucksess MW, Pohland AE. Mycotoxin Protocols, series methods in molecular biology. 2nd ed. Boston Humana Press; 2000: 15.
- ▶ 4. Creppy EE. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. Toxicol Lett 2002a;127(1-3): 19-28 .
- ▶ 5. Rustom, I. Y. S. (1997) Aflatoxin in food and feed: Occurrence, legislation and inactivation by physical methods. Food Chem. 59:57-67.
- ▶ 6. McLean, M., and Dutton, M.F. 1995. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. Pharmacology & Therapeutics, 65:163-192.
- ▶ 7. کریم گیتی ، بکا ئی سعید و خراسانی اکبر . ۱۳۷۸ ؛ مطالعه میزان آلودگی شیرهای تحویلی به کارخانجات شیر پاستوریزه تهران به آفلاتوکسین M1 با استفاده از روش الیزا ، مجله پژوهش و سازندگی شماره ۴۰، ۴۱ و ۴۲.
- ▶ 8. Adams Richard S; Kenneth B. Kephart; Virginia A. Ishler, Lawrence J. Hutchinson, Gregory W.Roth. .1993; Mold and mycotoxin problems in Livestock feeding. College of Agricultural Science, Penn State University www. Das. Edu/ teamdairy.
- ▶ 9. Kim EK; Shon DH; Ryu D; Park JW; Hwang HJ; Kim YB .2000; Occurrence of aflatoxin M1 in Korean products determined by ELISA and HPLC. Food Additives and Contaminant 17 (1): 59-64.
- ▶ 10. Mohamadi Sani A, Nikpooyan H, Moshiri R. Aflatoxin M1contamination and antibiotic residue in milk in Khorasan province, Iran. Food Chem Toxicol 2010; 48: 2130-2132.
- ▶ 11. Nemati M, Mesgari Abbasi M, Parsa Khankandi H, Ansarin M. A survey on the occurrence of aflatoxin M1 in milk samples in Ardabil, Iran. Food Control. 2010;21(7):1022-4.
- ▶ 12. Faletto MB, Gurtoo HL. The effect of inducers of mixed-function oxidases on hepatic microsomed mediated aflatoxin B1 transformation in C3H/10T1/2 cells. Toxicol Appl Pharmacol 1989; 98(2): 252- 62.
- ▶ 13. Tso J, Aga DS. A systematic investigation to optimize simultaneous extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of estrogens and their conjugated metabolites in milk. J Chromatogr A 2010;1217(29):4784-95.
- ▶ 14. Rahimi E, Bonyadian M, Rafei M, Kazemeini HR. Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk of five dairy species in Ahvaz, Iran. Food Chem Toxicol 2010; 48: 129-131.

ادامہ رفرنس

- ▶ 15. Frisvad JC, Skouboe P, Samson RA. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3 Omethylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 2005; 28(5): 442-53.
- ▶ 16. Salunkhe DK, Adsule RN, Padule DN. Aflatoxins in foods and feeds. BV Gupta. *Managing Diverter Metropolitan* 1987; 510.
- ▶ 17. Ismail Y, Ruston S. Aflatoxin in food and feed: Occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chem* 1996; 59(1): 57-64.
- ▶ 18. Nyikal J, Misore A, Nzioka C. Outbreak of aflatoxin poisoning eastern and central provinces, Kenya. *MMWR* 2004; 53(34): 790-3.
- ▶ 19. European Commission. COMMISSION REGULATION (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (text with EEA relevance). *Official Journal of the European Union*; L 364/15.
- ▶ 20. Institute of Standard and Industrial Research of Iran (ISIRI). Food & Feed - Mycotoxins- Maximum Tolerated level (Amendment No.1). ISIRI5925Amendment No. 1. Tehran-Iran: Institute of Standard and Industrial Research of Iran 2010 (Persian).
- ▶ 21. Hazir MS, Tahaee N, Rashidi K and Sheikhi H. [Study of aflatoxin M1 in row milk delivered to pasteurized milk company of Sanandaj] Persian. *J Med Sci Univ Kordestan* 2009; 13(3): 44-50.
- ▶ 22. Afzal M, Cheems RA, Chudhary RA. Incidence of aflatoxin and aflatoxin producing fungi in animal feed stuffs. *Mycopathologia* 1979; 69(3): 149-51.
- ▶ 23. Tajkarimi M, Ghaemmaghami SS, Motalebi A, et al. [Seasonal survey in content M1 aflatoxin in raw milk taken from 15dairy factory] Persian. *Pajouhesh va Sazandegi* 2007; 75(2): 2- 9.
- ▶ 24. Karim, G., Khorasani, A. (1998) Study on the contaminatin of raw bulk milk with aflatoxin M1 in Tehran area using ELISA method. *J. Pagouhesh-va- Sazandegi*. 4: 163-165.
- ▶ 25. Kamkar, A. (2002) Study on the contamination of UHT milks with aflatoxin M1 in the city of Tehran. *J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran*. 57:5-8.
- ▶ 26. Kamkar, A. (2008) The study of aflatoxin M1 in UHT milk samples by ELISA. *J. Vet. Res*. 63:7-12.

ادامه رفرنس

- ▶ 27. Alborzi S, Pourabbas B, Rashidi M, Astaneh B. Aflatoxin M1 contamination in pasteurized milk in Shiraz (south of Iran). Food Control 2006; 17(7): 582-584.
- ▶ 28. Kamkar A. (2005) A study on the occurrence of AFM1 in raw milk produced in Sarab city of Iran. Food Cont. 16: 593- 599.
- ▶ 29. Riazipour M. (2010) Measuring the amount of M1 Aflatoxin in pasteurized milks. Kowsar Medical Journal. Vol. 15, No. 2: 89-93.
- ▶ 30. Mokhtariyan H. (2005) Measuring the amount of M1 Aflatoxin in pasteurized milks in gonabad city. ofogh-e- danesh . Vol. 11, No3: 5-9.
- ▶ 31. Almasi A. (2011) The evaluation of aflatoxin M1 level in collected raw milk for pasteurized dairy factories of Kermanshah in 2010-2011 . Journal of Medical Science Research. inprinted .
- ▶ 32. ر. محمودی. and پ. زارع. مقدار آفلاتوکسین های تام و M1 در شیر و گوشت گاومیش کشتاری شمال غرب ایران. نشریه پژوهش های صنایع غذایی. جلد ۲۴، شماره ۱، ۱۳۹۳.
- ▶ 33. Vagef, R. and R. Mahmoudi, Occurrence of Aflatoxin M1 in raw and pasteurized milk produced in west region of Iran (during summer and winter). International Food Research Journal, 2013. 20(3): p. 1421-1425.
- ▶ 34. Mahmoudi, R., Seasonal pattern of aflatoxin M1 contamination in buffalo milk. Journal of Agroalimentary Processes and Technologies, 2014, 20(1), 9-13.
- ▶ 35. Tavakoli, h . Measuring the amount of M1 Aflatoxin in pasteurized milks . Kowsar Medical Journal, 2010, 15(2), 89-93 .
- ▶ 36. Bilandžić, N., Monitoring of aflatoxin M1 in raw milk during four seasons in Croatia. Journal of Food Control, August 2015, Volume 54, Pages 331-337.
- ▶ 37. Visciano, P. Schirone, M., A one-year survey on aflatoxin M1 in raw milk. Italian Journal of food science, 2015, 27(2), 271-276.
- ▶ 38. Beatriz Nappi Santili, A. and Costa de Camargo, A, Aflatoxin M1 in raw milk from different regions of Sao Paulo state - Brazil Food Additives & Contaminants: Part B: Surveillance, Volume 8, Issue 3, 2015.
- ▶ 39. Szonyi, B., Gizachew, D., Tegegne, A., Hanson, J., Grace, D., Aflatoxin M1 contamination of milk in the greater Addis Ababa milk shed, Ethiopia. International Livestock Research Institute (ILRI), 2015.
- ▶ 40. Redouane-Salah, S and Morgavi, D.P, and Arhab, R., Presence of aflatoxin M1 in raw, reconstituted, and powdered milk samples collected in Algeria. Journal of Environmental Monitoring and Assessment Volume 187, Issue 6, June 2015.
- ▶ 41. ش. قصوری. روند مصرف شیر در خانوارهای ایرانی طی سال های ۸۶-۹۱. آمار و شماره ۷، مرداد و شهریور ۹۳.